

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

549 782

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. September 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/083423 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/80, (74) Anwalt: ACKERMANN, Joachim; Postfach 11 13 26, 15/55, C12P 7/42 60048 Frankfurt (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/001430

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Februar 2004 (16.02.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 103 12 842.5 21. März 2003 (21.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEGUSSA AG [DE/DE]; 40474 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EGOROVA, Ksenia [RU/DE]; Beerentalweg 119, 21077 Hamburg (DE). ANTRANIKIAN, Garabed [DE/DE]; Schafkovengrund 3, 21218 Hittfeld-Waldesruhd (DE). TRAUTHWEIN, Harald [DE/DE]; Leonrodstr. 78, 80636 München (DE). VERSECK, Stefan [DE/DE]; Adalbert-Stifter-Str. 5, 63452 Hanau (DE). DINGERDISSEN, Uwe [DE/DE]; Linnéweg 1, 64342 Seeheim-Jugenheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/083423 A1

(54) Title: THERMALLY STABLE AMIDASES

(54) Bezeichnung: THERMISCH STABILE AMIDASEN

(57) Abstract: The invention relates to novel amidases that can be isolated from thermophilic bacteria, in particular from thermophilic actinomycetes, such as e.g. *Pseudonocardia thermophila*. The amidases obtained in this manner have a high temperature stability and are characterised by an enantioselective reaction for a wide range of substrates.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Amidasen, die aus thermophilen Bakterien isoliert werden können, insbesondere aus thermophilen Actinomyceten, wie z. B. *Pseudonocardia thermophila*, wobei sich die erhaltenen Amidasen nicht nur eine hohe Temperaturstabilität besitzen sondern sich auch durch die enantioselektive Umsetzung eines breiten Substratspektrums auszeichnen.

Thermisch stabile Amidasen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Amidasen, die aus thermophilen Bakterien isoliert werden können, insbesondere aus thermophilen Actinomyceten, wie z. B. *Pseudonocardia thermophila*, wobei die erhaltenen Amidasen nicht nur eine hohe Temperaturstabilität besitzen, sondern sich auch durch die enantioselektive 10 Umsetzung eines breiten Substratspektrums auszeichnen.

Enzymatische Verfahren halten zunehmenden Einzug in der Organischen Synthese, insbesondere bei der Durchführung enantioselektiver Synthesen, wie z. B. bei der Herstellung von optisch reinen pharmazeutischen Wirkstoffen, 15 Aminosäuren, Acrylsäuren oder Hydroxamsäuren. Weiterhin sind Amidasen bei dem Abbau von xenobiotischen Verbindungen beteiligt.

Amidasen katalysieren dabei die Umsetzung von Amiden zu ihren korrespondierenden Carbonsäuren und Aminen bzw. zu Ammoniak. Inzwischen 20 konnten eine Reihe von bakteriellen Amidasen identifiziert werden, darunter auch einige Amidasen aus mesophilen Actinomyceten (Bhalla, T.C., et al.; Science letters 11-12; 139-141, 1997; Hirrlinger, B.; et al. J. Bacteriol. 178, 3501-3507, 1996; Kobayashi, M., et al.; Eur. J. Biochem., 217, 327-336, 1993 ; Kotlova, E. K.; et al. ; Biochemistry (Mosc.) 64, 384-389, 1999 ; Mayaux, J.F. et al. ; J. Bacteriol. 25 173, 6694-6704, 1991; Mayaux, J.F.; J. Bacteriol. 172, 6764-6773, 1990; Nawaz, M.S., et al.; Appl. Environ. Microbiol., 60, 3343-3348, 1994), wobei allerdings keine thermostabile Amidase aus thermophilen Actinomyceten beschrieben wurde.

30 Thermoaktive Amidasen wurden demgegenüber bisher nur in *Klebsiella pneumoniae* NCTR 1 (Nawaz, M.S.; J. Bacteriol. 178, 2397-2401, 1996) und in *Sulfolobus solfataricus* (d'Abusco, A.S.; Extremophiles, 5, 183-192, 2001) gefunden. Gerade die Bereitstellung von weiteren Amidasen, insbesondere von

thermostabilen Amidasen wäre allerdings von großem technischen Interesse, da sich mit solchen Enzymen ein breiteres Spektrum an technisch durchführbaren enzymatischen Umsetzungen erschließt. Der vorliegenden Erfindung lag daher Aufgabe zu Grunde neue, thermisch stabile Amidasen bereit zu stellen.

5

Die Aufgabe wird durch Amidasen gelöst, die eine N-terminale Sequenz (**SEQ ID No. 1**)

I H M P D P D A V (SEQ ID No. 1)

10 und / oder eine Aminosäuresequenz

D G L P V G L M I V G K H F (SEQ ID No. 2)

15 oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50%, bevorzugt von über 70%, besonders bevorzugt von über 80%, zu **SEQ ID No. 1** und / oder **SEQ ID No. 2** enthalten.

20 Die neuen Amidasen sind z. B. aus thermophilen Bakterien, insbesondere aus thermophilen Actinomyceten, wie z. B. aus *Pseudonocardia thermophila* erhältlich. So kann eine in *Pseudonocardia thermophila* konstitutiv exprimierte Amidase mit einem Molekulargewicht zwischen 47 und 53 kDa isoliert werden, die bevorzugt als Dimer mit einem Molekulargewicht zwischen 100 und 140 kDa auftritt. Die Identifikation weiterer mutanter oder alleler Varianten der Amidasen kann z. B. anhand von Nukleinsäuresonden erfolgen, die zu einer DNA-Sequenz, codierend 25 für die Aminosäuresequenz **SEQ ID No. 1** oder **SEQ ID No. 2**, komplementär sind. Die Hybridisierung einer solchen Sonde erfolgt dabei unter stringenten Bedingungen, z. B. bei 60°C, 0,1xSSC, 0.1% SDS.

30 Die gefundenen nativen Amidasen können zwar durch die N-terminale Sequenz **SEQ ID No. 1** und die **SEQ ID No. 2** oder einer homologen Variante davon identifiziert werden, aber für die Amidaseaktivität ist zumindest die N-terminale Sequenz nicht zwingend erforderlich. Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch solche, oben beschriebenen Amidasen, deren N-terminales Ende künstlich

deletiert ist. Ebenso kann auch die Teilsequenz **SEQ ID No. 2** künstlich deletiert werden. Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Amidasen mit einer Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID No. 3** bzw. einer Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 50 % dazu, bevorzugt mit einer Homologie von 5 über 70 %, insbesondere von über 80 % dazu.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung stellen Nukleinsäuren codierend eine erfindungsgemäße Amidase mit einer Sequenz gemäß **SEQ ID No. 4**, oder mit einer Nukleotidsequenz mit einer Homologie von über 60 %, bevorzugt von über 75 %, insbesondere bevorzugt von über 90 % dazu, dar. **SEQ ID No. 4** codiert eine Amidase mit einer Aminosäuresequenz **SEQ ID No. 3**.

Die beschriebenen Amidasen können aus einem zellfreien Rohextrakt thermophiler Bakterien, der z. B. durch Ultraschallaufschluss von *Pseudonocardia thermophila* Zellen in einem Phosphatpuffer erhältlich ist, wie folgt gereinigt werden:

- a) Zentrifugation des Rohextraktes bei 10000 bis 20000 rpm und anschließende Zugabe einer 1 M Salzlösung, bevorzugt einer KCl-Lösung,
- b) chromatographische Trennung des Überstandes an einer hydrophoben Säule mit einem reversen Gradienten einer Salzlösung, bevorzugt einer KCl-Lösung, von 1 M bis 0 M,
- c) Ultrafiltration der aus b) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, an einer 10 kDa cut off Membran,
- d) Ionenaustauschchromatographie der aus c) erhaltenen Proteinfraktion mit einem Gradienten von 0 M bis 0,5 M einer Salzlösung, bevorzugt einer NaCl-Lösung
- e) Chromatographie der aus d) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, mit einer 0,1%igen Salzlösung, bevorzugt einer 150 mM NaCl-Lösung, und entsalzen der gereinigten Amidasefraktion.

30

Bevorzugt werden Alkalihalogenid-Salzlösungen, wie z. B. NaCl oder KCl - Lösungen zur Durchführung der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritten verwendet. Die chromatographischen Trennungen werden

bevorzugt zwischen pH 6,5 und 8,0 durchgeführt, wobei der pH-Wert, z. B. durch Verwendung eines Standard Phosphatpuffers (pH 7,2) eingestellt werden kann. Die Ionenaustauschchromatographie wird bevorzugt bei einem pH-Wert zwischen 7,5 und 8,5 durchgeführt.

5

Die Amidaseaktivität der erhaltenen Fraktionen kann mit Hilfe eines Hydrolyse-Tests bestimmt werden, wobei als Substrat Benzamid verwendet werden kann. Die enzymatisch entstehenden Produkte, Benzoesäure und Ammoniak, können mittels HPLC (Benzoesäure) bzw. mit der Phenyl-hydrochlorid Methode (Nachweis von Ammoniumionen) bestimmt werden.

10

Die so gewonnenen erfindungsgemäßen Amidasen zeichnen sich durch eine hohe Temperaturstabilität aus. Die spezifische Aktivität des Enzyms leidet bei kürzeren Reaktionszeiten von mehr als einer Stunde erst bei Temperaturen um 80 °C signifikant. Weiterhin besitzen die beschriebenen Amidasen ein Temperaturoptimum zwischen 50 und 75 °C. Die beschriebenen Amidasen zeigen darüber hinaus eine nennenswerte Aktivität zwischen 30 und 85 °C, bevorzugt sind die Enzyme allerdings bei Reaktionstemperaturen zwischen 60 und 70 °C verwendbar.

15

Weiterhin bleibt auch die Spezifische Aktivität der erfindungsgemäßen Amidasen über einen weiten pH-Wertbereich erhalten. So besitzen die Amidasen eine signifikante enzymatische Aktivität zwischen pH 3,5 und pH 11,5, wobei die spezifische Aktivität vom Optimum zwischen pH 6,0 und 7,5 über den Bereich von pH 4,5 und 10,0 kaum abfällt.

20

25 Durch das hohe Temperaturoptimum, die gute thermische Stabilität und den großen pH-Wertbereich in dem die Enzyme aktiv sind, erschließt sich ein interessanter Spielraum für die Optimierung Amidase katalysierter Prozesse, wie 30 der Hydrolyse von Amiden.

Es kann darüber hinaus gezeigt werden, dass die hier beschriebenen Amidasen unempfindlich gegenüber einer großen Zahl von Reagenzien und Ionen sind. So sind die Amidasen z. B. unempfindlich gegenüber Chelatbildnern wie z. B. EDTA oder gegenüber Detergenzien wie SDS oder Triton. Auch die Abhängigkeit von ionischen Co-Faktoren scheint nicht gegeben zu sein. Durch Zugabe von DTT kann sogar die enzymatische Aktivität der Amidasen gesteigert werden.

Die gewonnenen und charakterisierten erfindungsgemäßen Amidasen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften deutlich von den bisher bekannten mikrobiellen Amidasen, wie aus der exemplarischen Zusammenstellung in Tab. 4 ersichtlich ist. Es ist dabei insbesondere bemerkenswert, dass das isolierte Enzym aus *Pseudonocardia thermophila* die erste bekannte natürlich vorkommende homotrimere Amidase ist.

Tab. 4

Mikroorganismus	Expression	Charakteristika						
		Molmasse in kDa	Untereinheiten kDa (Anzahl)	pH-Opt.	T-Opt. in °C	IEF Punkt pH	Co-Faktoren	Substrat-spezifität (Amide)
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	konstitutiv	110	50 (2)	7.0	70	4.2	n.d.	Al, Ar, Cy, As
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3 ^{a)}	induzierbar	490	63 (8)	7.5	22	n.d.	n.d.	Al, Ar
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ^{b)}	induzierbar	39	monomer	7.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Brevibacterium</i> sp. R312 ^{c)}	induzierbar	110	43 (2)	7.5	30	n.d.	n.d.	Arylpropioamid
<i>Comamonas acidovorans</i> KPO ^{d)}	konstitutiv	54	monomer	8.0	30	n.d.	n.d.	Ketoprofen
DSM 6320 ^{e)}	induzierbar	125	66 (2)	8.5	40	4.2	n.d.	L-Carnitin
<i>Helicobacter pylori</i> ^{f)}	konstitutiv	40	monomer	7.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCCTR1 ^{g)}	induzierbar	62	monomer	7.0	65	n.d.	Co&Fe	Al
<i>Mycobacterium neoaurum</i> ^{h)}	konstitutiv	136	40 (4)	8.0	50	4.2	n.d.	Al, As
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ⁱ⁾	konstitutiv	50	monomer	7.5	22	n.d.	n.d.	Cy
<i>Ochrobactrum anthropi</i> SV3 ^{j)}	induzierbar	40	63 (8)	9.0	22	n.d.	n.d.	As
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{k)}	induzierbar	200	monomer	7.0	55	n.d.	n.d.	Al

Tab. 4 Fortsetzung

Mikroorganismus	Expression	Charakteristika						
		Molmasse in kDa	Untereinheiten kDa (Anzahl)	pH-Opt.	T-Opt. in °C	IEF pH	Punkt	Metall
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23 ^{l)}	induzierbar	105	54 (2)	7.0	50	n.d.	no metal	Al, Ar, Cy, As
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1 ^{m)}	induzierbar	110	55 (2)	7.9	55	n.d.	n.d.	Al, Ar, Cy, As
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8 ⁿ⁾	konstitutiv	150	42 (4)	7.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50 ^{o)}	induzierbar	480	61 (8)	7.5	55	n.d.	n.d.	Al, Ar, Cy
<i>Rhodococcus</i> sp. ^{p)}	konstitutiv	360	44,5 (8)	8.5	40	4.0	Fe	Al
<i>Rhodococcus</i> sp. NHB-2 ^{q)}	induzierbar	n.d.	n.d.	8.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Rhodococcus</i> sp. ^{r)}	induzierbar	118	48,5 (2)	7.5	30	n.d.	n.d.	Arylpropionamid
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^{s)}	induzierbar	38	monomer	6.0	40	5.8	n.d.	As, Peptide
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ^{t)}	induzierbar	56	monomer	7.5	95	5.94	n.d.	Al, Ar, Cy

Al = Aliphatische Amide, Ar = Aromatische Amide, Cy = Cyclische Amide, As = Aminosäureamide, n.d. = nicht bestimmt

a) Trott et al.; Mikrobiology 147, 1815-1824, 2001 ; b) Cheong, et al., Enzyme Microb. Technol. 26, 152-158, 2000 ; c) Mayaux et al., J. Bacteriol. 172, 6764-6773, 1990 ; d) Yamamoto et al., Appl. & Environ. Microbiol. 1, 152-155, 1996; e) Joeres et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 606-610, 1994; f) Skouloubris, et al., Mol. Microbiol. 25, 989-998, 1997 ; g) Nawaz et al., J. Bacteriol. 178, 2397-2401, 1996; h) Hermes et al., Appl. & Environ. Microbiol. 1, 153-159, 1994; i) Boshoff et al., J. Bacteriol. 180, 5809-5814, 1998; j) Komeda et al., Eur. J. Biochem. 267, 2028-2035, 2000 ; k) Nawaz et al., Appl. Biochem. & Biotechnol. 28/29, 865-875, 1991; l) Ciskanik et al., Appl. Environ. Microbiol. 61, 998-1003, 1995, m) Kobayashi et al., Eur. J. Biochem., 217, 327-336, 1993 ; n) Kotlova et al., Biochemistry (Mosc), 64, 384-389, 1999 ; o) Hirrlinger et al., J. Bacteriol. 178, 3501-3507, 1996 ; p) Nawaz et al., Appl. Environ. Microbiol. 60, 3343-3348, 1994; q) Bhalla et al., Science letters, 11-12, 139-142, 1997 ; r) Mayaux et al., J. Bacteriol., 173, 6694-6704, 1991 ; s) Neumann et al., Appl. Microbiol. & Biotechnol. 58, 773-780, 2002; t) d'Abusco et al., Extremophiles, 5, 183-192, 2001

Ein großer Vorteil der neuen Amidasen ist deren breites Substratspektrum. So lassen sich mit den Enzymen sowohl aliphatische, aromatische, cyclische, heterocyclische und Aminosäureamide hydrolysieren. Wobei insbesondere aliphatische Amide mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen, aromatische Amide mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, heterocyclische Amine mit 4 bis 10 Kohlenstoffatomen und mit ein bis vier Heteroatomen, z. B. ausgewählt aus der Gruppe N, S, O, P oder L-Aminosäureamide umgesetzt werden können.

Die beschriebenen Amidasen zeichnen sich neben dem breiten Substratspektrum auch durch eine hohe Enantioselektivität aus. Insbesondere die Herstellung von S-Enantiomeren, wie z. B. von (hetero-)cyclischen Säuren und insbesondere aromatischen, aliphatischen oder aromatisch-aliphatischen Säuren, ist bevorzugt.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse einer SDS-PAGE Elektrophorese mit unterschiedlichen Enzymproben, die während der Aufreinigung entnommen wurden (Bahnen 2 bis 5). Die Bahnen 6 und 7 zeigen ein Zymogramm des Rohextraktes und der aufgereinigten Probe. Bahn 1 ist ein Molekulargewichtsstandard.

Fig. 2 zeigt das Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung der nativen Amidase mittels Gelfiltration. Fig. 3 zeigt die Spezifische Aktivität einer erfindungsgemäßen, gereinigten Amidase in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur, Fig. 4 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Fig. 5 zeigt die Stabilität der gereinigten Amidase bei unterschiedlichen Temperaturen. In Fig. 6 ist die Acetyltransferase-Aktivität bezogen auf beispielhafte Substrate wiedergegeben. In Fig. 7 ist die enantioselektive enzymatische Umsetzung mit 2-Phenylpropionamid als Substrat gezeigt.

Im folgenden werden einige Ausführungsbeispiele gegeben, die allerdings nicht einschränkend zu verstehen sind.

Beispiel 1: Kultivierung von *Pseudonocardia thermophila* (DSMZ 43832)

Der verwendete *Pseudonocardia thermophila* Stamm wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) bezogen. Die Zellen wurden, sofern nichts anderweitig erwähnt ist, wie in Yamaki, T.; et al.; J. Ferment. Bioeng., 83, 474-477, 1997 beschrieben, kultiviert. Das Medium (pH 7.2) enthält pro Liter: 5g Hefeextrakt, 4g lösliche Stärke, 0,3g KH₂PO₄, 0,6g Na₂HPO₄, 0,1g MgSO₄ · 7H₂O, 5g NaCl. Die Zellen wurden nach 3 Tagen Kultivierung in einem Schüttelkolben bei 50 °C, 150 rpm geerntet. Die Ausbeute betrug 10g Zellen (Nassgewicht) pro Liter Medium.

Beispiel 2: Reinigung der Amidase:

Die Aufreinigung der Amidase erfolgte bei Raumtemperatur. 7g Zellmaterial (Nassgewicht) wurden dazu 2 mal mit 60 mM K-Na Phosphatpuffer (Standardpuffer), pH 7,2 gewaschen, in 50 ml des Puffers resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 13000rpm, wurde eine 1 M KCl-Lösung zu dem zellfreien Extrakt gegeben. Der Überstand (50ml) wurde auf eine hydrophobe Phenyl-Sepharose Fast Flow Säule (Pharmacia, Sweden) gegeben, die mit einem 1 M KCl Standardpuffer equilibriert war. Das Protein wurde dann mit einem linearen reversen Gradienten einer 1 M KCl bis 0 M KCl -Lösung eluiert. Die Amidase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen 2 L Standardpuffer (pH 8,0) dialysiert. Anschließend wurde die erhaltene Proteinfraktion auf das 12-fache konzentriert und durch eine 10 kDa cut-off Membran (Amicon) ultrafiltriert. Die Probe wurde dann über eine Ionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt. Dazu wurde eine UNO-Q12 Säule (BioRad) verwendet, wobei das gereinigte Protein mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (0 bis 0,5 M NaCl in Standardpuffer pH 8,0) gereinigt wurde. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt, 2-fach konzentriert und über eine preparative HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule (Pharmacia, Sweden), mit Standardpuffer, pH 7,2, enthaltend 150 mM NaCl, fraktioniert. Die Proteinfraktion mit Amidaseaktivität wurden gesammelt und über eine Sephadex PD-10 Säule

(Pharmacia, Sweden) entsalzt. Die Proteinkonzentration wurde mit Rinderserumalbumin als Standard, wie in Bradford, M.M.; Anal. Biochem. 71, 248-254, 1976 beschrieben, bestimmt.

5 Das Ergebnis der Reinigung ist in Figur 1 und Tabelle 1 dargestellt.

Der Reinigungserfolg wurde dabei mit einer sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) Gelektrophorese überprüft. Dazu wurde ein vorgefertigtes Gel (Novex, Invitrogen, Niederlande) mit einem Tris-Glycin Gradienten von 4-20% verwendet. Als Standardproteine wurden Phosphorilase b (94kDa), Bovine Albumin (67kDa), Chicken Ovalbumin (43kDa), Carbonic Anhydrase (30kDa), Soybean Trypsin Inhibitor (20.1kDa) und Bovine α -Lactalbumin (14.4kDa) (Pharmacia, Schweden) verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Blue R-250 angefärbt.

15

Um die Amidaseaktivität auf dem Gel zu verifizieren wurde das SDS-Gel in 2,5% Triton X-100 60 Minuten gewaschen und anschließend 30 Minuten bei 60 °C in K-Na-Phosphat Puffer (pH 7,0) enthaltend 70 mM Propionamid und 0,7 M Hydroxylaminhydrochlorid, wobei der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,0 eingestellt wurde, inkubiert. Das Gel wurde danach in Wasser für 2-3 sec. gewaschen und mit einer sauren Eisenchlorid-Lösung (0,1 M FeCl₃ in 0,5 M HCl) bedeckt.

20

Das aufgetragene Eisen reagiert mit der enzymatisch entstehenden Hydroxamsäure unter Bildung einer rot-braunen Bande. Die Intensität der Färbung entspricht der enzymatischen Aktivität der Amidase. Der eben beschriebene Aktivitätstest wird im folgenden in der Beschreibung auch als Zymogram bezeichnet.

25

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse einer SDS-PAGE Elektrophorese mit unterschiedlichen Proben (jeweils 5 μ g Protein), aus den während der Reinigung erhaltenen Fraktionen. Die Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt. Die Bahn 1 zeigt die Standardproteine, Bahn 2 den Rohextrakt, Bahn 3 eine Probe nach Reinigung

30

an der Phenyl-Sepharose Säule, Bahn 4 eine Probe nach Ionenaustausch-Chromatographie an einer UNO Q12 Säule, Bahn 5 eine Probe nach Reinigung an einer Superdex 200 Säule. Die Bahnen 6 und 7 zeigen das Zymogramm des Rohextraktes und der aufgereinigten Probe.

5

Tab.1: Ergebnisse zur Reinigung der Amidase aus *Pseudonocardia thermophila*.

Reinigungs-schritt	Protein in mg (gesamt)	Gesamt-aktivität (U) ^a	Spezifisch e Aktivität (U)	Ausbeute (U x mg ⁻¹)	Reinigungs-grad
Rohextrakt ^b	85	34.7	0.4	100	1-fach
Phenyl-Sepharose	4.4	25.2	5.7	72.6	14-fach
UNO Q12	2.0	16.8	8.5	48.3	21-fach
Superdex 200	0.46	9.1	19.5	26.2	48-fach

^{a)} Ein U der Amidase katalysiert die Bildung von 1 µmol Benzoesäure pro Minute und pro mg Protein unter Standardbedingungen.

^{b)} Nach Kultivierung bei 50°C, Zentrifugation der 1-Liter-Kultur (7g Zellmaterial (Nassgewicht)), zweimaliges Waschen mit Standardpuffer (pH 7,2) und Ultraschallaufschluss.

10

15

Mit dem beschriebenen Reinigungsverfahren wurde die enzymatisch aktive Amidase mit einer Ausbeute von 26,2 % erhalten. Die Spezifische Aktivität betrug 19,5 U/mg Protein bezogen auf Benzamid als Substrat. Die Amidaseaktivität wurde durch eine HPLC-Analyse der Produkte des enzymatisch umgesetzten Benzamids bestätigt.

Beispiel 3: Bestimmung des Molekulargewichts der Amidase

20

25

Das Molekulargewicht der Amidase wurde mittels Gelfiltration an einer Superdex 200 Säule (Amersham) unter Verwendung eines 60 mM K-Na-Phosphatpuffers (pH 7,2), enthaltend 150 mM NaCl, bestimmt. Die Säule wurde mit Blue Dextran (2000 kDa), Sweet Potato β -Amylase (200 kDa), Yeast Alcohol Dehydrogenase (150 kDa), Bovine Serum Albumin (66 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa) und Cytochrome c (12,4 kDa) (Sigma Aldrich, Deutschland) kalibriert.

Das Molekulargewicht des nativen Proteins wurde so auf ca. 110 kDa bestimmt (siehe dazu Fig. 2, Bahn 2). Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität des gereinigten Proteins wurde ein Zymogram (Bahn 3) erstellt. Bahn 1 enthält den Molekulargewichtsstandard.

5

Demgegenüber wurde das Molekulargewicht des Enzyms mittels SDS-PAGE Elektrophorese auf 50 kDa bestimmt (siehe dazu Fig. 1). Die enzymatische Aktivität wurde anhand des Zymograms (Bahn 6, Rohextrakt und Bahn 7, gereinigtes Enzym) überprüft.

10

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die gereinigte Amidase bevorzugt als Dimer aus zwei identischen ca. 50 kDa großen Untereinheiten vorliegt.

15

Weiterhin wurde die gereinigte Amidase einer Endoproteinase Asp-N-Spaltung unterworfen. Im Anschluss kann aus dem ca. 110 kDa Protein ein Peptid mit der Masse 1482u isoliert werden, das mittels Edman-Abbau sequenziert wurde. Erhalten wurde die **SEQ ID No.2**.

20

Beispiel 4: Bestimmung des isoelektrischen Punktes

25

Der isoelektrische Punkt wurde mittels isoelektrischer Fokussierung mit einem Novex Polyacrylamidgel (pH3-10) und unter Verwendung einer Novex Elektrophoresekammer anhand den Angaben des Herstellers (Novex, Invitrogen, Niederlande) bestimmt. Der isoelektrische Punkt der gereinigten Amidase wurde so mit pH 4,2 ermittelt.

Beispiel 5: N-terminale Sequenzierung der gereinigten Amidase

30

Die gereinigte Amidase wurde vom SDS-PAGE Gel durch Elektroblotting auf eine PVDF blotting Membran überführt. Die Aminosäuresequenz des N-terminalen

Endes des so erhaltenen Enzyms wurde mittels Edman-Abbau bestimmt. Erhalten wurde die **SEQ ID No. 1**.

Ein Sequenzvergleich mit anderen N-terminalen Enden bekannter Amidasen
5 ergab keine signifikanten Homologien.

Weiterhin wurde die gereinigte trimere Amidase einer Endoproteinase Asp-N Spaltung unterworfen. Im Anschluss kann aus dem ca. 150 kDa Protein ein Peptid mit der Masse 1482u isoliert werden, dass mittels Edman-Abbau sequenziert
10 wurde. Erhalten wurde die **SEQ ID No. 2**.

Beispiel 6: Enzym-Assays

Allgemeines: Assay zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität

15 Zur Durchführung des Hydrolyse-Assays wurde, sofern nicht anders erwähnt, eine 5 mM Benzamid-Lösung in 500 µl eines 60 mM K-Na-Phosphatpuffers, pH 7,2, verwendet. Die enzymatische Umsetzung erfolgte eine Stunde bei 70 °C unter Zugabe von 5 µg des Enzyms. Die Reaktion wurde durch Kühlung des
20 Reaktionsansatzes auf Eis gestoppt. Die Konzentration der enzymatisch erhaltenen Produkte (Benzoesäure und Ammoniak) wurde mittels HPLC und spektrometrisch unter Verwendung des Ammoniak Kits Spectroquant 114752 (Merck, Deutschland) bestimmt.
Eine Unit (U) an Amidaseaktivität wird definiert als die Enzymmenge, die die
25 Bildung von 1 µmol Benzoesäure pro Minute katalysiert.

Assay zur Bestimmung der Acyltransferase Aktivität

Die Hydroxamsäure Bildung wird durch 10-minütige Inkubation der Amidase bei
30 70 °C in einer Mischung aus 20 mM K-Na-Phosphat Puffer, pH 7,2, 100 µl einer 50-100 mM Amid- und 0,7 M Hydroxylaminlösung (eingestellt auf pH 7,0 unter Zugabe von 10 M NaOH) bestimmt. Die Hydroxylaminlösung wurde dazu frisch

präpariert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 50 °C – 70 °C wurden die Reaktionsbehälter auf Eis gestellt und 1 ml einer sauren Eisenchloridlösung (0.1 M FeCl₃ in 50 ml einer 0.5 M HCl-Lösung) zugegeben. Die erhaltene Menge an Hydroxamat wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt.

5

Beispiel 6.1: Einfluss von Temperatur und pH-Wert

Die Temperaturabhängigkeit der Amidaseaktivität wurde unter Standardbedingungen bei pH 7.2 bestimmt. Dabei wurden die Reaktionstemperaturen 10 zwischen 30 °C und 90 °C variiert.

Die Ergebnisse sind in Fig. 3 graphisch dargestellt, es wurde ein Temperaturoptimum bei ca. 70 °C ermittelt.

15 Weiterhin wurde die Temperaturstabilität der Enzyme zwischen 50 °C und 80 °C über einen längeren Zeitraum überprüft. Die isolierte Amidase zeigt eine ausgezeichnete thermische Stabilität bei 60 °C (obere Kurve, Fig. 5) und immer noch eine gute Stabilität bei 70 °C (mittlere Kurve, Fig. 5). Bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C lässt die enzymatische Aktivität bei pH 7,2 20 allerdings schnell nach (untere Kurve, Fig. 5).

Das pH-Wert Optimum wurde anhand der Hydrolyse von Benzamid (5 mM) bei 70 °C in einem 50 mM Puffer aus Natriumacetat (für pH 2-5) oder Natriumphosphat (für pH 5-13), wobei der pH-Wert unter Verwendung von 10 M NaOH sukzessive 25 bis auf pH 13 eingestellt wurde, durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Fig. 4 graphisch dargestellt, es wurde ein pH-Wert Optimum bei ca. 7 ermittelt.

30 Beispiel 6.2: Einfluss von Metallen und Inhibitoren

Zur Untersuchung des Einflusses bestimmter Reagenzien und Ionen auf die Amidaseaktivität wurde eine Lösung enthaltend 5 µg der Amidase und das Reagenz oder Ion 1 h bei 22 °C in 50 mM Phosphat-Puffer vorinkubiert. Anschließend wurde eine 5 mM Lösung Benzamid in 50 mM Phosphat-Puffer zugegeben bis die Endkonzentration des Reagenz im Reaktionsansatz 1 mM betrug. Die Reaktion erfolgte 1 h bei 70 °C. Die katalytische Aktivität wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

10

Tab. 2:

Reagenz, 1mM	Amidaseaktivität in %
Cu ²⁺	26
Ni ²⁺	42
Zn ²⁺	93
Mg ²⁺	90
Ca ²⁺	85
Mn ²⁺	98
Fe ²⁺	80
Fe ³⁺	96
Ba ²⁺	87
Co ²⁺	0
EDTA	100
Iodacetamid	90
Iodacetat	22
SDS	100
Triton X-100	100
DTT	120

Beispiel 6.3: Untersuchung der Substratspezifität der isolierten Amidase

15

Die Substratspezifität der Amidase wurde bei drei unterschiedlichen Temperaturen unter Berücksichtigung des jeweils verwendeten Substrates getestet. Zur Hydrolyse von Aminosäureamiden wurde die Reaktionsmischung 3 h bei 30 °C umgesetzt, im Falle der aliphatischen und cyclischen Amide eine 1 h bei 50 °C und bei aromatischen Amidsubstraten 1h bei 70 °C. Die enzymatische Aktivität wurde dann, wie oben beschrieben, bestimmt. Als Kontrolle wurde jeder Ansatz 5 ohne Enzym verwendet.

Die getesteten Substrate und die dazugehörige Amidaseaktivität sind in Tabelle 3 10 wiedergegeben:

Tab. 3

Substrat	Spezifische Aktivität ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Aliphatische Amide	
Formamid	9.2
Harnstoff	17.5
Acetamid	15.7
N-methylharnstoff	—
Acrylamid	26.8
DL-Lactamid	18.9
Malonamid	7.4
Propionamid	25.4
Fumaranamid	—
Isobutyramid	13.5
Methacrylamid	23.5
Succinamid	4.0
Pivalinamid	14.9
Adipamid	12.0
Hexanamid	9.3
Cyclohexanamid	10.1

Aromatische Amide	
Sulfanylamid	—
2-Aminobenzamid	3.4
4-Aminobenzamid	6.5
Benzamid	19.4
o-Hydroxybenzamid	7.4
p-Hydroxybenzamid	12.1
N-Phenylharnstoff	—
Acetanilid	--
Benzylcarbamat	--
o-Tolylamid	--
m-Tolylamid	12.7
p-Tolylamid	13.1
2-Phenylpropionamid	15.8
3-Indolylacetamid	7.56
Heterocyclen	
Pyrazinamid	11.2
Nicotinamid	11.6
Isonicotinamid	7.1
Aminosäureamide	
L-Alaninamid	10.5
L-Methioninamid	14.4
L-Prolinamid	13.0
L-Valinamid	13.0
L-Leucinamid	10.8
L-Tryptophanamid	10.3
2-Hydroxy-4-(Methylthio)-buttersäureamid	5.7
L-tert.-Leucinamid	0.08

Beispiel 6.4: Untersuchung der Enantioselektivität der isolierten Amidase

Dazu wurden 10 µg der gereinigten Amidase mit einer 5 mM racemischen 2-Phenylpropionamid Lösung 3 h bei 70 °C inkubiert, wobei das Endvolumen des Reaktionsansatzes 500 µl betrug. In 30-minütigen Abständen wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und durch eine HPLC-Messung analysiert. Die Produktbestimmung und die Quantifizierung der R- und S- Stereoisomere des 2-phenylpropionamids wurden durch Injektion definierter Mengen der entsprechenden Reinsubstanzen als Standard ermittelt. Der Enantiomerenüberschuss (ee) wurde anhand des Peakflächenverhältnisses erhalten durch die chirale HPLC-Messung errechnet ($ee^p = (S-R)/(S+R)$; $ee^p(\%) = (S-R)/(S+R) \times 100$; mit p = Produkt).

Für die HPLC Messungen wurde eine chirale Chirobiotic T Säule (Astec, Whippny, USA) benutzt. Als Solvent wurde Ethanol und 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2 mit einem Volumenverhältnis von 20:80 eingesetzt. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussgeschwindigkeit von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Ammoniak-Konzentration wurde mit der Phenol-hypochlorid Methode unter Verwendung des Ammoniak Kits Spectroquant 114752 (Merck, Deutschland) untersucht, wobei die freigesetzte Ammoniakmenge spektrometrisch unter Verwendung von Ammoniumchlorid als Standard bestimmt wurde.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Fig. 7 graphisch dargestellt (S -Enantiomer obere Kurve; R -Enantiomer untere Kurve). Die gereinigte Amidase ist im Hinblick auf 2-Phenylpropionamid als Substrat hoch S-selektiv. Nach 60 Minuten war der Wert für den Enantiomerenüberschuss ee^p größer 95, bei einem Umsatz von 50%.

Patentansprüche:

- 5 1. Mono- oder multimere Amidasen dadurch gekennzeichnet, dass die Amidase eine N-terminale Sequenz **SEQ ID No. 1** oder eine N-terminale Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 1** enthält.
- 10 2. Mono- oder multimere Amidasen dadurch gekennzeichnet, dass die Amidase eine Sequenz **SEQ ID No. 2** oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 2** enthält.
- 15 3. Mono- oder multimere Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Amidase eine N-terminale Sequenz **SEQ ID No. 1** und die **SEQ ID No. 2** oder eine N-terminale Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 1** und eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 2** enthält.
- 20 4. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 mit einem Molekulargewicht des nativen monomeren Enzyms zwischen 47 und 53 kDa.
5. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus thermophilen Bakterien erhältlich ist.
- 25 6. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Actinomyceten erhältlich ist.
7. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus *Pseudonocardia thermophila* erhältlich ist.
- 30 8. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 erhältlich nach einem Verfahren umfassend die Verfahrensschritte

5 a) Zentrifugation des zellfreien Rohextraktes eines thermophilen Bakteriums bei 10000 bis 20000 rpm und anschließende Zugabe einer 1 M Salzlösung,

10 b) chromatographische Trennung des Überstandes an einer hydrophoben Säule mit einem reversen Gradienten einer Salzlösung von 1 M bis 0 M,

c) Ultrafiltration der aus b) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, an einer 10 kDa cut off Membran,

d) Ionenaustauschchromatographie des aus c) erhaltenen Proteinfraktion mit einem Gradienten von 0 M bis 0,5 M einer Salzlösung,

15 e) Chromatographie der aus d) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, mit einer 100 bis 200 mM Salzlösung und entsalzen der gereinigten Amidasefraktion.

9. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das N-terminale Ende der Amidase enthaltend die **SEQ ID No. 1** oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 1** ganz oder teilweise deletiert ist.

10. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die **SEQ ID No. 2** oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 2** der Amidase ganz oder teilweise deletiert ist.

15 20 25 30 11. Amidasen nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym als Monomer oder Dimer, bestehend aus zwei monomeren Amidaseeinheiten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, vorliegt.

12. Amidasen nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID No. 3** oder eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 50 % dazu besitzt.

13. Nukleinsäuren codierend eine erfindungsgemäße Amidase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Sequenz gemäß **SEQ ID No. 4** oder eine Nukleotidsequenz mit einer Homologie von über 60 % dazu besitzt.
5
14. Verwendung von Amidasen gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Hydrolyse von Amiden oder zur Acylierung.
10
15. Verwendung von Amidasen gemäß Anspruch 14 zur Hydrolyse von aliphatischen Amiden, aromatischen Amiden, cyclischen Amiden, heterocyclischen Amiden oder Aminosäureamiden.
15
16. Verwendung von Amidasen gemäß Anspruch 15 zur enantioselektiven Hydrolyse von Amiden.
17. Verwendung von Amidasen gemäß Anspruch 16 zur Herstellung von S-stereoisomeren Säuren.
20
18. Verfahren zur enzymatisch-katalytischen Hydrolyse von Amiden dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion durch eine Amidase gemäß den Ansprüchen 1 bis 13 katalysiert wird.
25
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur zwischen 30 °C und 85 °C durchgeführt wird.
20.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 75 °C durchgeführt wird.
30

21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 11,5 erfolgt.

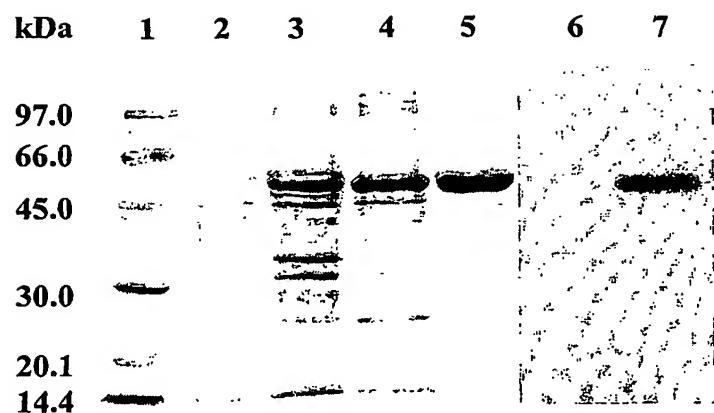
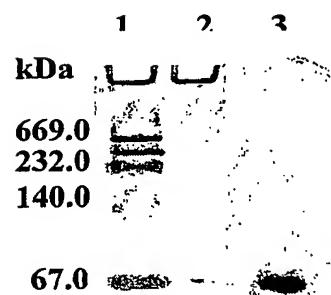
Fig. 1**Fig. 2**

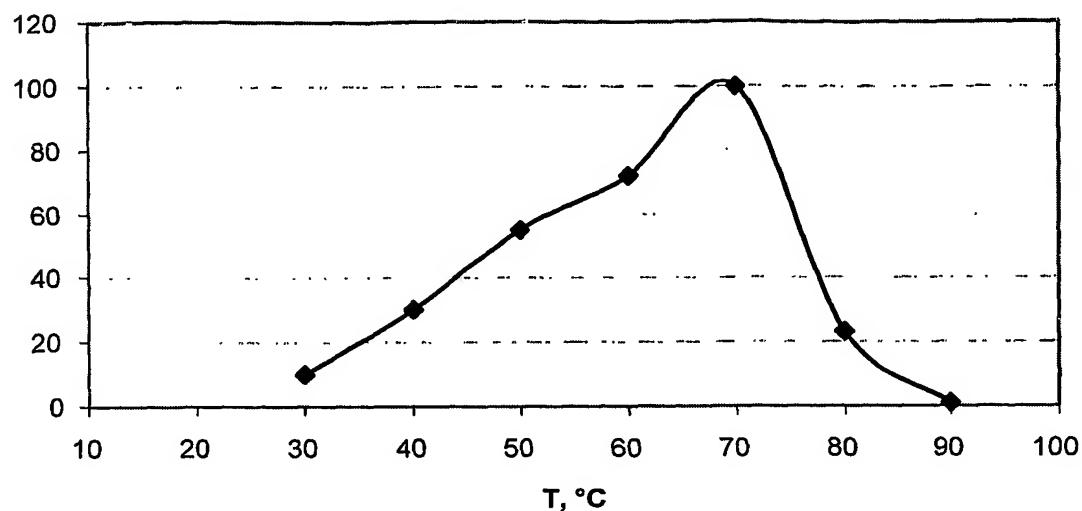
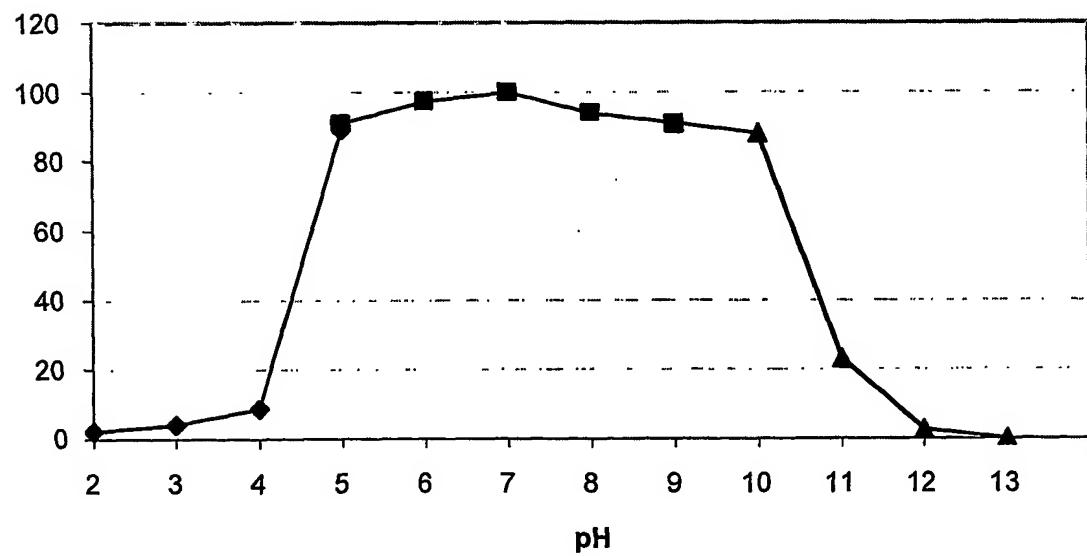
Fig. 3**Fig. 4**

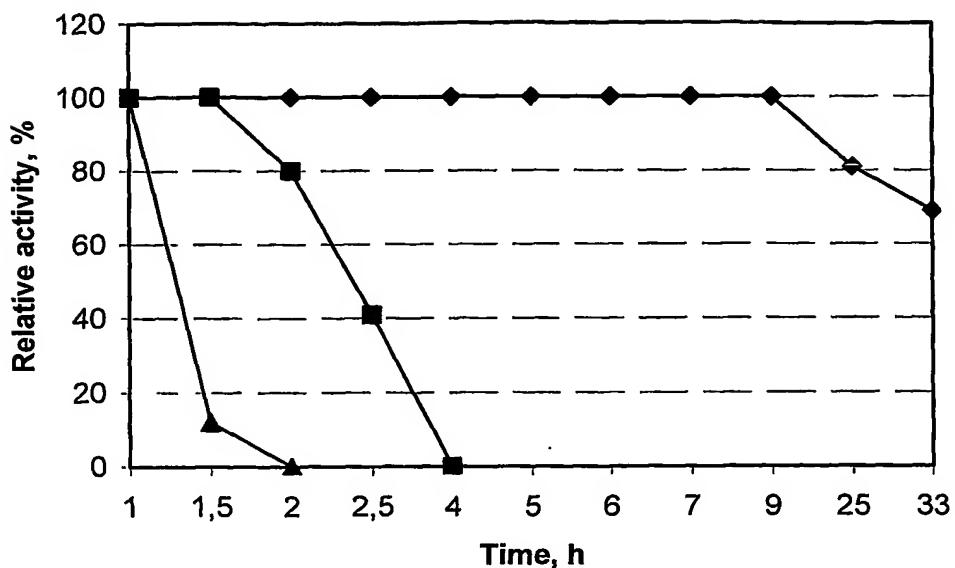
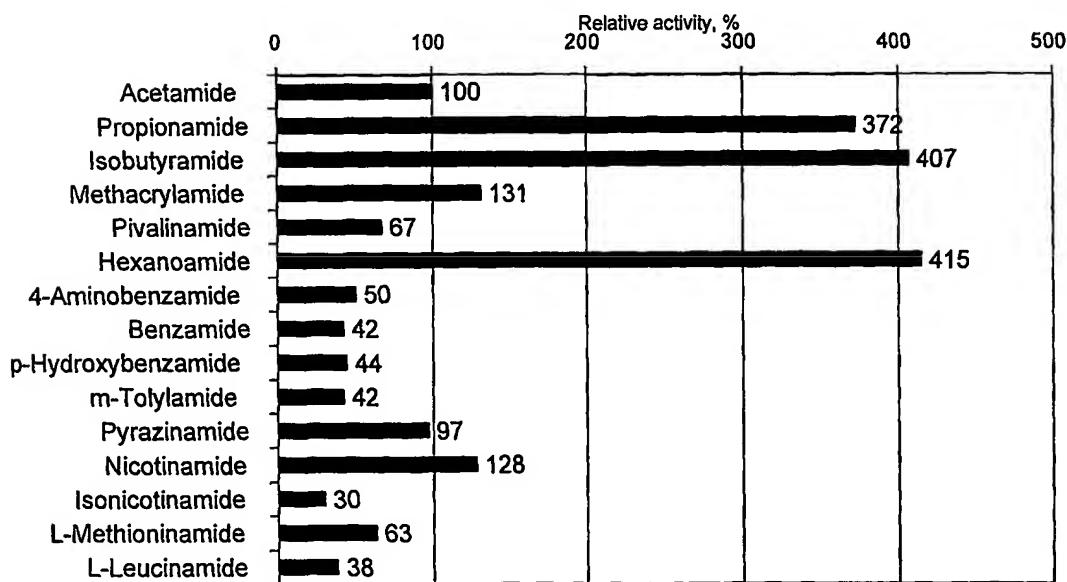
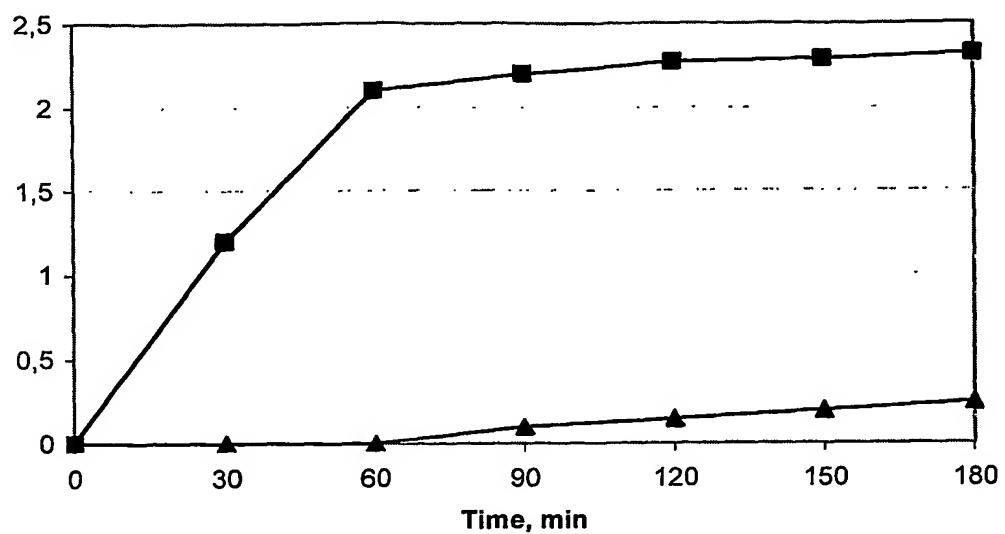
Fig. 5**Fig. 6**

Fig. 7

1/4
SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

<120> Thermisch stabile Amidasen

<130> 202dg07.de

<140>

<141>

<150> DE 103 12 842

<151> 2003-03-21

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<400> 1

Ile His Met Pro Asp Pro Asp Ala Val

1

5

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<400> 2

Asp Gly Leu Pro Val Gly Leu Met Ile Val Gly Lys His Phe

1

5

10

<210> 3

<211> 509

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<400> 3

Met Ile His Met Pro Asp Pro Asp Ala Val Ala Arg Met Ala Ala Glu

1

5

10

15

Gly Arg Phe Gly Ile Pro Val Val Val Ile Cys Arg Thr Tyr His Asp

2/4

20

25

30

Leu Gly His Arg Pro Ala Arg Leu Val Glu Gln Gly Arg Arg Ala Val
35 40 45

Arg Gly Gly Gly Pro His Pro Ala Ala Ala Leu Val Asp Pro Pro Arg
50 55 60

Arg Arg Gly Arg Gln Ala Arg Arg Val Gly Gly Ala Asp Leu Asp His
65 70 75 80

Arg Asn Leu Gly Gly Ala Ala Arg Arg Pro His Gly Arg Gly Gln Asp
85 90 95

Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn Gly Ser Arg Thr Leu
100 105 110

Glu Gly Phe Val Pro Ala Glu Asp Ala Thr Val Val Ser Arg Leu Leu
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Thr Ile Ala Gly Lys Ser Val Cys Glu Asp Leu Cys
130 135 140

Phe Ser Gly Gly Ser His Thr Ser Lys Pro Gly Thr Val His Asn Pro
145 150 155 160

Trp Asp Met Ser Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ala
165 170 175

Leu Val Ala Ala Gly Glu Val Asp Met Ala Ile Gly Gly Asp Gln Gly
180 185 190

Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ser Ala Tyr Cys Gly Thr Val Gly His Lys
195 200 205

Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Gly Phe Pro Ile Glu Gln
210 215 220

Ser Ile Asp His Leu Gly Pro Ile Thr Arg Thr Val Ala Asp Ala Ala
225 230 235 240

Leu Met Leu Ser Val Ile Ala Gly Arg Asp Gly Leu Asp Pro Arg Gln
245 250 255

Pro Asp Val Val Glu Val Gln Asp Tyr Val Gly Ala Leu Ala Glu Ser
260 265 270

Val Ser Gly Leu Arg Ile Gly Val Leu Gln Glu Gly Phe Gly His Pro

275	280	285
Asn Ser Glu Pro Glu Val Asp Asp Thr Val Arg Ala Ala Val Gly Thr		
290	295	300
Leu Arg Glu Ala Gly Phe Thr Val Glu Asp Val Ser Val Pro Trp His		
305	310	315
Leu His Ala Thr Ala Ile Trp Asp Val Leu Ala Thr Glu Gly Gly Leu		
325	330	335
Trp Gln Met Val Glu Gly Asn Ala Tyr Gly Met His Trp Lys Gly His		
340	345	350
Tyr Asp Pro Ser Leu Ile Ala Tyr Tyr Gly Arg Lys Trp Arg Glu Asp		
355	360	365
Pro Ala Gln Phe Ser Glu Thr Val Lys Leu Val Ala Leu Ala Gly Arg		
370	375	380
Tyr Ala Leu Thr Thr Gln Tyr Gly Arg His Tyr Ala Met Ala Arg Asn		
385	390	395
Leu Ala Pro Lys Leu Val Ala Ala Tyr Asp Ala Ala Leu Ser Asn Tyr		
405	410	415
Asp Val Leu Val Met Pro Thr Leu Pro Met Arg Ala Thr Val Leu Pro		
420	425	430
Gly Pro Asp Ala Pro Val Glu Glu Ile Leu Ala Arg Gly Leu Glu Met		
435	440	445
Leu Ala Asn Thr Ala Pro Phe Asp Val Thr Gly His Pro Ala Cys Ser		
450	455	460
Val Pro Ala Gly Leu Ala Asp Gly Leu Pro Val Gly Leu Met Ile Val		
465	470	475
Gly Lys His Phe Asp Asp Ala Thr Val Leu Lys Val Ala Asn Ala Phe		
485	490	495
Glu Gln Ala Val Gly Gly Phe Pro Thr Pro Ala Ala Glx		
500	505	

<210> 4

<211> 1527

<212> DNA

<213> Pseudonocardia thermophila

<400> 4

atgatccaca tgccggaccc ggacgcggtg gcccggatgg ccgcagaggg tcggttcggg 60
atccccgtag tagtgcgtcg ccgtacccac caegaccccg gtcaccggcc tgctcggtc 120
gtggaacaag gtcgaagagc tgtacgcggg ggtggccccc accccgcgc agcgctcg 180
gaccgcggcc gacgcggagg acgacaagct cggcgcgtgg gcggtgcaga cctcgatcac 240
cgaaacccctcg gaggggccgc tcgcggccg caccggtcgcg gtcaggacaa cgtcgccgtc 300
gccggcgtgc cgatgcgtaa cggatgcgg accctggagg gcttcgtccc cgccgaggac 360
gccaccgtcg tgtcccggtc gtcgcgcgc ggcgcgacca tcgcccggcaa gtcgggtgtc 420
gaggacctgt gcttcgtccgg cggctcgac accagcaagc cgggaaccgt gcacaacccg 480
tgggacatga gccgcgtggc gggtggttcc tcgagcggta gccccggcgt ggtggccgc 540
ggcgaggtcg acatggccat cggcggtgac cagggcgggt cgtccgcac cccgtcgccg 600
tactgcggca cggcgtggca caagccgacc cacggcctgg tgccgtacac cggaggcttc 660
ccgatcgagc agtcgatcga ccacccctggc cccatcaccc gcaccgtcgcc cgacgcgcgc 720
ctcatgctgt cggtgatcgc cggccgcgac gggctcgacc cgcgcagcc cgacgtcg 780
gaggtgcagg actacgtcg cggcgtggcc gagtcggta gccccgtcgcatcgccgtc 840
ctgcaggagg gcttcggta ccccaactcc gagcccgagg tcgacgacac cgtgcgcgt 900
gctgtcgccga cactgcgcga gggccgcgtc accgtcgagg acgtctcggt cccgtggcac 960
ctgcacgcga cggccatctg ggacgtgctc gccaccggagg gccccgtcgcatcgccgtc 1020
gagggcaacg cctacggcat gcactggaaag gcccactacg accccgtcgct catcgccctac 1080
tacgggcgcga agtggcggga ggacccggcg cagttctccg agacggtaa gctcgccgtc 1140
ctcgccggcc gctacgcgtc cacgacccag tacgggcgcac actacgcgt ggcgcgcac 1200
ctcgcccccga agctggtcgc ggcctacgac gccccgtcgcatcgccgtc 1260
atgccgacgc tgccgtatgcg cggccaccgtc ctgccccggcc cggacgcgcgcccgtcgaggag 1320
atccctgcaca gggccctggaa gatgctggcc aacaccgcac cgttcgacgt caccgggcac 1380
ccggccctgtc ctgtcccgcc cggcctcgcc gacggcttc cggtcggccct gatgatcg 1440
ggcaaggact tcgacgcacgc caccgtcgatc aaggtggcga acgccttcga acaggccgtc 1500
ggcggcttcc cgaccccccgc tgccctga 1527

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/001430A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/80 C12N15/55 C12P7/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBL, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, PAJ, WPI Dat

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EBI; 20 July 2001 (2001-07-20) "Bacillus stearothermophilus glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit C (gatC), glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit A (gatA), and glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit B (gatB) genes, complete cds." Database accession no. AY040860 XP002281305 Gen gatA the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	2,4-8,10

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 2004

Date of mailing of the International search report

14/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Steffen, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/001430

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOBAYASHI M ET AL: "AMIDASE COUPLED WITH LOW-MOLECULAR-MASS NITRILE HYDRATASE FROM RHODOCOCCUS RHODOCHROUS J1. SEQUENCING AND EXPRESSION OF THE GENE AND PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE GENE PRODUCT" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 217, 1993, pages 327-336, XP000652066 ISSN: 0014-2956 page 333, left-hand column, paragraph 2 -page 334, right-hand column, paragraph 2; figures 3,4,7,8; table 3 ---	2,4-8, 10-21
X	D'ABUSCO ANNA SCOTTO ET AL: "Molecular and biochemical characterization of the recombinant amidase from hyperthermophilic archaeon <i>Sulfolobus solfataricus</i> " EXTREMOPHILES, vol. 5, no. 3, June 2001 (2001-06), pages 183-192, XP002281301 ISSN: 1431-0651 page 188, right-hand column, paragraph 2 -page 189, left-hand column, last paragraph; figure 3; tables 1,2 ---	2,4-8, 10-12, 14-21
A	NAWAZ M S ET AL: "Physical, biochemical, and immunological characterization of a thermostable amidase from <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTR 1." JOURNAL OF BACTERIOLOGY. UNITED STATES APR 1996, vol. 178, no. 8, April 1996 (1996-04), pages 2397-2401, XP002281302 ISSN: 0021-9193 the whole document ---	
A	BAEK DAE HEOUN ET AL: "New thermostable D-methionine amidase from <i>Brevibacillus borstelensis</i> BCS-1 and its application for D-phenylalanine production." ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 32, no. 1, 2 January 2003 (2003-01-02), pages 131-139, XP002281303 ISSN: 0141-0229 the whole document ---	
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/001430

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YAMAKI T ET AL: "CLONING AND SEQUENCING OF A NITRILE HYDRATASE GENE FROM PSEUDONOCARDIA THERMOPHILA JCM3095" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, vol. 83, no. 5, 1997, pages 474-477, XP002050253 ISSN: 0922-338X the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE GENBANK PROTEIN 'Online! NIH; 6 June 2002 (2002-06-06) PARKHILL, J. ET AL.: "Putative DNA helicase 'Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi!'" Database accession no. CAD06784 XP002281306</p>	
A	<p>the whole document</p> <p>& PARKHILL, J. ET AL.: "Complete genome sequence of a multiple drug resistant salmonella enterica serovar typhi CT18" NATURE, vol. 413, 25 October 2001 (2001-10-25), pages 848-852, XP002965014</p>	
T	<p>the whole document</p> <p>---</p> <p>EGOROVA ET AL.: "Purification and properties of an enantioselective and thermoactive amidase from the thermophilic actinomycete Pseudonocardia thermophila" APPLIED MIRCROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 'EPUB AHEAD OF PRINT!', 'Online! 21 April 2004 (2004-04-21), pages 1-15, XP002281304</p> <p>Retrieved from the Internet: <URL:http://springerlink.metapress.com/med/ia/D86TGDP AFP7WWG98TY47/Contributions/J/A/F/Y/JAFY3JRJ0C6XF985_html/fulltext.html> 'retrieved on 2004-05-24!</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/001430

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N9/80 C12N15/55 C12P7/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EMBL, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, PAJ, WPI Dat

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EBI; 20. Juli 2001 (2001-07-20) "Bacillus stearothermophilus glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit C (gatC), glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit A (gatA), and glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit B (gatB) genes, complete cds." Database accession no. AY040860 XP002281305 Gen gatA das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	2, 4-8, 10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

24. Mai 2004

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

14/06/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Steffen, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/001430

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOBAYASHI M ET AL: "AMIDASE COUPLED WITH LOW-MOLECULAR-MASS NITRILE HYDRATASE FROM RHODOCOCCUS RHODOCHROUS J1. SEQUENCING AND EXPRESSION OF THE GENE AND PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE GENE PRODUCT" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, Bd. 217, 1993, Seiten 327-336, XP000652066 ISSN: 0014-2956 Seite 333, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 334, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildungen 3,4,7,8; Tabelle 3	2,4-8, 10-21
X	D'ABUSCO ANNA SCOTTO ET AL: "Molecular and biochemical characterization of the recombinant amidase from hyperthermophilic archaeon <i>Sulfolobus solfataricus</i> " EXTREMOPHILES, Bd. 5, Nr. 3, Juni 2001 (2001-06), Seiten 183-192, XP002281301 ISSN: 1431-0651 Seite 188, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 189, linke Spalte, letzter Absatz; Abbildung 3; Tabellen 1,2	2,4-8, 10-12, 14-21
A	NAWAZ M S ET AL: "Physical, biochemical, and immunological characterization of a thermostable amidase from <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTR 1." JOURNAL OF BACTERIOLOGY. UNITED STATES APR 1996, Bd. 178, Nr. 8, April 1996 (1996-04), Seiten 2397-2401, XP002281302 ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument	
A	BAEK DAE HEOUN ET AL: "New thermostable D-methionine amidase from <i>Brevibacillus borstelensis</i> BCS-1 and its application for D-phenylalanine production." ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, Bd. 32, Nr. 1, 2. Januar 2003 (2003-01-02), Seiten 131-139, XP002281303 ISSN: 0141-0229 das ganze Dokument	

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/001430

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>YAMAKI T ET AL: "CLONING AND SEQUENCING OF A NITRILE HYDRATASE GENE FROM PSEUDONOCARDIA THERMOPHILA JCM3095" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, Bd. 83, Nr. 5, 1997, Seiten 474-477, XP002050253 ISSN: 0922-338X das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE GENBANK PROTEIN 'Online! NIH; 6. Juni 2002 (2002-06-06) PARKHILL, J. ET AL.: "Putative DNA helicase 'Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi!'" Database accession no. CAD06784 XP002281306 das ganze Dokument</p>	
A	<p>& PARKHILL, J. ET AL.: "Complete genome sequence of a multiple drug resistant salmonella enterica serovar typhi CT18" NATURE, Bd. 413, 25. Oktober 2001 (2001-10-25), Seiten 848-852, XP002965014 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
T	<p>EGOROVA ET AL.: "Purification and properties of an enantioselective and thermoactive amidase from the thermophilic actinomycete Pseudonocardia thermophila" APPLIED MIRCROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 'EPUB AHEAD OF PRINT!', 'Online! 21. April 2004 (2004-04-21), Seiten 1-15, XP002281304 Gefunden im Internet: <URL:http://springerlink.metapress.com/media/D86TGDP AFP7WWG98TY47/Contributions/J/A/F/Y/JAFY3JRJ0C6XF985_html/fulltext.html> 'gefunden am 2004-05-24! das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-21